

证书号第2142239号



发明专利证书

发明名称：樟芝子实体苯类化合物、制备与分析方法

发明人：吴永昌；张芳荣；吕美津；杜英齐；吴东颖；许育铭

专利号：ZL 2011 1 0078772.3

专利申请日：2011年03月28日

专利权人：高雄医学大学

授权公告日：2016年07月06日

本发明经过本局依照中华人民共和国专利法进行审查，决定授予专利权，颁发本证书并在专利登记簿上予以登记。专利权自授权公告之日起生效。

本专利的专利权期限为二十年，自申请日起算。专利权人应当依照专利法及其实施细则规定缴纳年费。本专利的年费应当在每年03月28日前缴纳。未按照规定缴纳年费的，专利权自应当缴纳年费期满之日起终止。

专利证书记载专利权登记时的法律状况。专利权的转移、质押、无效、终止、恢复和专利权人的姓名或名称、国籍、地址变更等事项记载在专利登记簿上。



局长
申长雨

申长雨





(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102584777 B

(45) 授权公告日 2016. 07. 06

(21) 申请号 201110078772. 3

(22) 申请日 2011. 03. 28

(30) 优先权数据

100100874 2011. 01. 10 TW

(73) 专利权人 高雄医学大学

地址 中国台湾高雄市三民区十全一路 100 号

(72) 发明人 吴永昌 张芳荣 吕美津 杜英齐
吴东颖 许育铭

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

代理人 陶贻丰 杨淑媛

(51) Int. Cl.

C07D 317/64(2006. 01)

C07C 43/215(2006. 01)

C07C 41/38(2006. 01)

G01N 24/08(2006. 01)

G01N 30/36(2006. 01)

G01N 30/72(2006. 01)

G01N 30/74(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 102145021 A, 2011. 08. 10,

CN 101214238 A, 2008. 07. 09,

TW 201029658 A, 2010. 08. 16,

TW 201029658 A, 2010. 08. 16,

Jih-Jung Chen et al..Anti-inflammatory Benzenoids from Antrodia camphorata. 《Journal of Natural Products》. 2007, 第 70 卷 (第 6 期), 989-992.

Jih-Jung Chen et al..Anti-inflammatory Benzenoids from Antrodia camphorata. 《Journal of Natural Products》. 2007, 第 70 卷 (第 6 期), 989-992.

Li-Shian Shi et al..Biologically active constituents from the fruiting body of Taiwanofungus camphoratus. 《Bioorganic & Medicinal Chemistry》. 2010, 第 19 卷 677-683.

审查员 汪泉

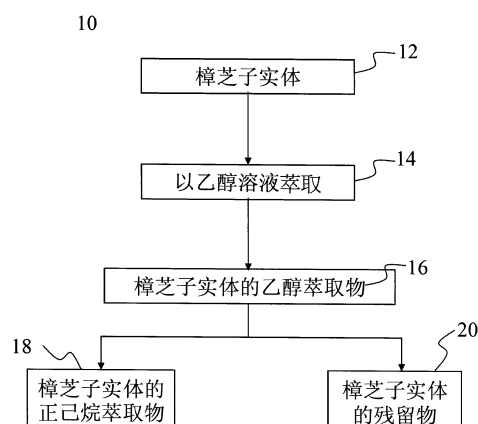
权利要求书2页 说明书10页 附图14页

(54) 发明名称

樟芝子实体苯类化合物、制备与分析方法

(57) 摘要

本申请公开一种樟芝子实体的正己烷萃取物的制备方法,是按次序以乙醇溶液和正己烷溶液萃取樟芝子实体,获得樟芝子实体的正己烷萃取物。该樟芝子实体的正己烷萃取物包括至少一种苯类化合物,经过色谱法、核磁共振图谱及高效液相色谱法确定出至少一种苯类化合物内含 4,7-二甲氧基-5-(3-甲基丁-3-烯-1-炔基)-6-甲基-1,3-苯并间二氧杂环戊烯、4,7-二甲氧基-5-甲基-1,3-苯并间二氧杂环戊烯、安多凯因 A 及其组合的含量。此外,本申请也可应用于检测樟芝保健食品或药品或樟芝子实体中的苯类化合物的含量,具有产业上的价值。



1. 一种樟芝子实体的正己烷萃取物中的至少一种苯类化合物的检测方法,该至少一种苯类化合物选自4,7-二甲氧基-5-(3-甲基丁-3-烯-1-炔基)-6-甲基-1,3-苯并间二氧杂环戊烯,所述检测方法包括下列步骤:

提供樟芝子实体;

以乙醇溶液萃取该樟芝子实体,获得樟芝子实体的乙醇萃取物;

以正己烷溶液萃取该樟芝子实体的乙醇萃取物,获得该樟芝子实体的正己烷萃取物;

对所述正己烷萃取物进行 ^1H 核磁共振图谱分析,确认所述正己烷萃取物中该至少一种苯类化合物的特征信号。

2. 如权利要求1所述的检测方法,还包括步骤:将该樟芝子实体研磨成细粉。

3. 如权利要求1所述的检测方法,当该樟芝子实体的正己烷萃取物溶于 $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ 时,其 ^1H 核磁共振图谱于 $\delta 6.4$ 至 6.6 之间具有芳香环上的单个氢的信号,于 $\delta 5.8$ 至 6.1 之间具有亚甲二氧基信号,于 $\delta 5.4$ 至 5.6 之间具有双键信号,于 $\delta 3.7$ 至 4.1 之间显示出甲氧基信号,于 $\delta 2.1$ 至 2.6 之间显示出芳香环上的甲基的信号。

4. 如权利要求1所述的检测方法,当该樟芝子实体的正己烷萃取物溶于 CDCl_3 时,其 ^1H 核磁共振图谱于 $\delta 6.2$ 至 6.4 之间具有芳香环上的单个氢的信号,于 $\delta 5.8$ 至 6.0 之间具有亚甲二氧基信号,于 $\delta 5.2$ 至 5.5 之间具有双键信号,于 $\delta 3.6$ 至 4.1 之间具有甲氧基信号,于 $\delta 2.1$ 至 2.4 之间显示出芳香环上的甲基的信号。

5. 一种用以检测樟芝子实体的正己烷萃取物中的苯类化合物的含量的方法,该苯类化合物包括4,7-二甲氧基-5-(3-甲基丁-3-烯-1-炔基)-6-甲基-1,3-苯并间二氧杂环戊烯、4,7-二甲氧基-5-甲基-1,3-苯并间二氧杂环戊烯及安卓凯因A,该方法包括下列步骤:

以乙醇溶液萃取该樟芝子实体,获得樟芝子实体的乙醇萃取物;

以正己烷溶液萃取该樟芝子实体的乙醇萃取物,获得樟芝子实体的正己烷萃取物;

以 ^1H 核磁共振图谱仪检测所述正己烷萃取物中是否具有表明该苯类化合物的特征信号;及

当所述正己烷萃取物中具有表明该苯类化合物的特征信号时,以高效液相色谱仪检测该樟芝子实体的正己烷萃取物中该苯类化合物的含量。

6. 如权利要求5所述的方法,还包括步骤:将该樟芝子实体研磨成细粉。

7. 如权利要求5所述的方法,其中该特征信号选自由芳香族信号、双键信号、甲氧基信号及甲基信号及其组合所组成的组之一。

8. 如权利要求7所述的方法,在 $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ 溶液条件下,其中该芳香族信号于 $\delta 6.4$ 至 6.6 之间以及 $\delta 5.8$ 至 6.1 之间,该双键信号于 $\delta 5.4$ 至 5.6 之间,该甲氧基信号于 $\delta 3.7$ 至 4.1 之间,且该甲基信号于 $\delta 2.1$ 至 2.6 之间。

9. 如权利要求7所述的方法,在 CDCl_3 溶液条件下,其中该芳香族信号于 $\delta 6.2$ 至 6.4 之间以及 $\delta 5.8$ 至 6.0 之间,该双键信号于 $\delta 5.2$ 至 5.5 之间,该甲氧基信号于 $\delta 3.6$ 至 4.1 之间,且该甲基信号于 $\delta 2.1$ 至 2.4 之间。

10. 如权利要求5所述的方法,其中该高效液相色谱仪包括检测器,该检测器选自由全波长检测器、单波长检测器及电喷雾离子化质谱仪及其组合组成的组中之一。

11. 如权利要求10所述的方法,该单波长检测器的波长设定为 254nm 以及 270nm 。

12. 一种检测方法,以 ^1H 核磁共振图谱仪同时检测樟芝子实体的正己烷萃取物中的多个

苯类化合物各自的含量,该正己烷萃取物是将该樟芝子实体依序以乙醇及正己烷萃取而获得,该多个苯类化合物包含4,7-二甲氧基-5-(3-甲基丁-3-烯-1-炔基)-6-甲基-1,3-苯并间二氧杂环戊烯、4,7-二甲氧基-5-甲基-1,3-苯并间二氧杂环戊烯及安卓凯因A,该检测方法包括下列步骤:

提供作为内标的吡嗪;

将该吡嗪加入该正己烷萃取物中,并溶于 CDCl_3 溶液;

在以该 ^1H 核磁共振图谱仪进行分析后,计算各该多个苯类化合物的特征信号与该吡嗪的特征信号的积分面积比值,以定量公式计算该正己烷萃取物中该多个苯类化合物各自的含量。

13.如权利要求12所述的检测方法,其中该正己烷萃取物中该多个苯类化合物各自的含量以下列步骤计算:当该 ^1H 核磁共振图谱仪上出现甲氧基信号时,以该内标为基础计算该甲氧基信号的第一强度,当该 ^1H 核磁共振图谱仪上出现第一甲基信号时,以该内标为基础计算该第一甲基信号的第二强度,以及当该 ^1H 核磁共振图谱仪上出现该第二甲基信号时,以该内标为基础计算该第二甲基信号的第三强度,并且由该第一、该第二及该第三强度计算所述正己烷萃取物中4,7-二甲氧基-5-(3-甲基丁-3-烯-1-炔基)-6-甲基-1,3-苯并间二氧杂环戊烯、4,7-二甲氧基-5-甲基-1,3-苯并间二氧杂环戊烯及安卓凯因A的含量。

樟芝子实体苯类化合物、制备与分析方法

技术领域

[0001] 本申请涉及一种樟芝子实体萃取物,本申请尤其涉及一种樟芝子实体的苯类组合物、制备与分析方法。

背景技术

[0002] 樟芝(*Androdia cinnamomea*)又称樟菇、牛樟菇、牛樟芝等,为台湾特有的真菌菌种,生长于海拔400至2000公尺特有的牛樟树(*Cinnamomum kanehirai*)树干腐朽的心材内壁,或枯死倒伏的牛樟木材阴暗潮湿的表面。因此,要寻找到野生的樟芝子实体或确认此多孔菌目(Aphyllophorales)真菌菌株的外观并不容易,也由于其生物活性成分具潜在的医药价值,因此樟芝的价格居高不下。

[0003] 由于樟芝子实体不易被发现及以人工方式培养,目前市面上多为樟芝菌丝体(mycelia)产品,其宣称具有抗癌、减少治疗引起的症状及其他副作用。此外,樟芝菌丝体产品也被发现具有抗氧化、抗过敏、免疫刺激效果(Liu等人,2007)。这些产品宣称具有与樟芝子实体相似的主要成分,包括具有细胞毒性效果的三萜类(triterpenes)、类固醇(steroid)及具有免疫刺激性的多糖体等(Chen等人,1995;Yang等人,1996)。

[0004] 传统上,樟芝被应用于健康食品,以避免发炎、过敏、皮肤癣、肝癌的发生,因此,樟芝菌丝体及子实体萃取物被认为是具有潜力的化学治疗药物,以对抗肝癌、前列腺癌、膀胱癌、肺癌细胞等(Chen等人,2007;Hsu等人,2007;Peng等人,2007;Shetty等人,2005;Wu等人,2006),但各类有效成分的活性机制与抑制癌症能力并未被完全理清及探讨。

[0005] 此外,专利号TWI299665揭露了樟芝萃取物及其制备方法,其是以乙醇萃取樟芝菌丝体获得多糖体,用以抑制基质金属蛋白酶的活性,但并非以樟芝子实体进行萃取,其产物也未能抑制癌细胞的生长;专利号TWI279439揭露了以樟芝菌丝体进行培养,通过调整培养时的酸碱值获得培养物,并未揭露萃取方法;而专利号TW591110揭露了由樟芝菌丝体萃取出 γ -氨基丁酸,其先冷冻干燥樟芝菌丝体,再以水或有机溶剂萃取。上述这些发明皆未以樟芝子实体进行有机溶剂或水的萃取,而且未鉴定出其所内含的指标性二次代谢化合物。

[0006] 本申请申请人鉴于现有技术中的不足,经过悉心试验与研究,并以锲而不舍的精神,最终构思出本申请“樟芝子实体的苯类组合物、制备与分析方法”,能够克服现有技术的不足,以下为本申请的简要说明。

发明内容

[0007] 本发明从樟芝子实体中萃取较低极性分层,但具有活性萃取物,并确定其所包含的新颖苯类化合物。通过该萃取方法,本发明可应用于检验樟芝保健食品、药物或樟芝子实体的苯类化合物的种类及含量,可作为产业上用途。

[0008] 本发明提出一种樟芝子实体的正己烷萃取物的制备方法,包括下列步骤:提供樟芝子实体;以乙醇溶液萃取樟芝子实体,获得樟芝子实体的乙醇萃取物;及以正己烷溶液萃

取樟芝子实体的乙醇萃取物,获得樟芝子实体的正己烷萃取物。其中樟芝子实体的正己烷萃取物包括至少一种苯类化合物。

[0009] 该至少一种苯类化合物包括4,7-二甲氧基-5-(3-甲基丁-3-烯-1-炔基)-6-甲基-1,3-苯并间二氧杂环戊烯(4,7-dimethoxy-5-(3-methylbut-3-en-1-ynyl)-6-methyl-1,3-benzodioxole)、4,7-二甲氧基-5-甲基-1,3-苯并间二氧杂环戊烯(4,7-dimethoxy-5-methyl-1,3-benzodioxole)及/或安卓凯因A(antrocaphine A)。而该制备方法还包括将樟芝子实体研磨为细粉的步骤。

[0010] 本发明另提出一种以前述制备方法所制备的樟芝子实体的正己烷萃取物,包括至少一种苯类化合物,当溶于 C_5D_5N 时,其 1H 核磁共振图谱于 $\delta 6.4$ 至 6.6 之间具有芳香环上单个氢的信号,于 $\delta 5.8$ 至 6.1 之间具有亚甲二氧基信号,于 $\delta 5.4$ 至 5.6 之间具有双键信号,于 $\delta 3.7$ 至 4.1 之间显示出甲氧基信号,于 $\delta 2.1$ 至 2.6 之间显示出芳香环上甲基的信号。

[0011] 该樟芝子实体的正己烷萃取物以乙醇溶液及正己烷溶液依序萃取樟芝子实体所获得。而所包括的至少一种苯类化合物的种类也如前所述。

[0012] 本发明另提供一种樟芝子实体的正己烷萃取物,包括至少一种苯类化合物,当该樟芝子实体的正己烷萃取物溶于 $CDCl_3$ 时,其 1H 核磁共振图谱于 $\delta 6.2$ 至 6.4 之间具有芳香环上的单个氢的信号,于 $\delta 5.8$ 至 6.0 之间具有亚甲二氧基信号,于 $\delta 5.2$ 至 5.5 之间具有双键信号,于 $\delta 3.6$ 至 4.1 之间具有甲氧基信号,于 $\delta 2.1$ 至 2.4 之间显示出芳香环上甲基的信号。

[0013] 本发明另提供一种方法,用以检测樟芝子实体中至少一种苯类化合物的含量,该方法包括下列步骤:以乙醇溶液萃取樟芝子实体,获得樟芝子实体的乙醇萃取物;以正己烷溶液萃取樟芝子实体的乙醇萃取物,获得樟芝子实体的正己烷萃取物;以 1H 核磁共振图谱仪检测樟芝子实体的正己烷萃取物中是否具有至少一种苯类化合物;当樟芝子实体的正己烷萃取物中具有至少一种苯类化合物时,以高效液相色谱仪检测樟芝子实体的正己烷萃取物中苯类化合物的含量。

[0014] 前述检测方法还包括以 1H 核磁共振图谱分析仪检测苯类化合物的信号,信号选自自由芳香族信号、双键信号、甲氧基信号及甲基信号及其组合组成的组之一。

[0015] 当樟芝子实体的正己烷萃取物溶于 C_5D_5N 溶液时,在 1H 核磁共振图谱上所出现的信号的化学偏移如上所述。同理,当溶于 $CDCl_3$ 溶液时,其在 1H 核磁共振图谱上所出现的信号的化学偏移亦如上所述。

[0016] 根据上述构想,实验所使用的高效液相色谱仪包括检测器,该检测器包括全波长检测器、单波长检测器及/或电喷雾离子化质谱仪。而单波长检测器的波长设定为 $254nm$ 和 $270nm$ 。

[0017] 本发明另提出一种以 1H 核磁共振图谱检测含苯类化合物的樟芝子实体的正己烷萃取物的方法,该 1H 核磁共振图谱以吡嗪(pyrazine)为内标,该方法包括下列步骤:检测樟芝子实体的正己烷萃取物是否具有甲氧基信号于 $\delta 3.9$ 至 4.0 之间;检测樟芝子实体的正己烷萃取物是否具有第一甲基信号于 $\delta 2.1$ 至 2.2 之间;以及检测樟芝子实体的正己烷萃取物是否具有第二甲基信号于 $\delta 2.3$ 至 2.4 之间。

[0018] 而出现甲氧基信号、第一甲基信号及第二甲基信号分别表示樟芝子实体的正己烷萃取物具有4,7-二甲氧基-5-(3-甲基丁-3-烯-1-炔基)-6-甲基-1,3-苯并间二氧杂环戊烯、4,7-二甲氧基-5-甲基-1,3-苯并间二氧杂环戊烯及安卓凯因A。

[0019] 再者,当出现甲氧基信号时,以内标为基础计算甲氧基信号的第一强度。同理,当出现第一甲基信号和/或第二甲基信号时,以内标为基础计算第一甲基信号的第二强度和/或第二甲基信号的第三强度,并且由第一、第二及第三强度依序计算樟芝子实体的正己烷萃取物中4,7-二甲氧基-5-(3-甲基丁-3-烯-1-炔基)-6-甲基-1,3-苯并间二氧杂环戊烯、4,7-二甲氧基-5-甲基-1,3-苯并间二氧杂环戊烯及安卓凯因A的含量。

[0020] 本发明另提出一种自樟芝子实体中萃取出的苯类化合物,其化学式如前一段所述的化合物及其组合。

[0021] 本发明另提出一种检测方法,是以高效液相色谱仪同时检测4,7-二甲氧基-5-(3-甲基丁-3-烯-1-炔基)-6-甲基-1,3-苯并间二氧杂环戊烯、4,7-二甲氧基-5-甲基-1,3-苯并间二氧杂环戊烯及安卓凯因A的含量。

[0022] 本发明另提出一种检测方法,是以 ^1H 核磁共振质谱仪同时检测4,7-二甲氧基-5-(3-甲基丁-3-烯-1-炔基)-6-甲基-1,3-苯并间二氧杂环戊烯、4,7-二甲氧基-5-甲基-1,3-苯并间二氧杂环戊烯及安卓凯因A至少其中之一的含量。

附图说明

[0023] 图1为本发明的樟芝子实体的正己烷萃取物的制备方法流程图。

[0024] 图2为正己烷萃取物溶于 $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ 在400MHz的 ^1H 核磁共振图谱。

[0025] 图3为本发明的化合物1的NOESY关系示意图。

[0026] 图4为本发明的化合物1的HMBC关系示意图。

[0027] 图5(a)至图5(d)分别为(a)樟芝子实体的正己烷萃取物、(b)化合物1、(c)化合物2及(d)化合物3溶于 CDCl_3 在400MHz的 ^1H 核磁共振图谱。

[0028] 图6(a)至图6(c)分别为(a)樟芝子实体的正己烷萃取物与内部标准品吡嗪溶于 CDCl_3 在400MHz的 ^1H 核磁共振图谱、(b)化合物1标的特征信号放大图、(c)化合物2与化合物3标的特征信号放大图。

[0029] 图7(a)及图7(b)分别为(a)樟芝子实体的正己烷萃取物以及(b)化合物1~3于254nm波长的高效液相色谱图谱。

[0030] 图8(a)及图8(b)分别为(a)樟芝子实体的正己烷萃取物及(b)化合物1~3于270nm波长的高效液相色谱图谱。

具体实施方式

[0031] 本申请所提出的“樟芝子实体的苯类组合物、制备与分析方法”将可由以下的实施例说明而得到充分了解,使得本领域技术人员可以据以完成本发明,然而本申请的实施并非由下列实施例限制其实施方案,本领域技术人员仍可依据示例性实施例的精神推演出其他实施例,该实施例都应该属于本发明的范围。

[0032] 实验1、樟芝子实体的正己烷萃取物的制备

[0033] 请参阅图1的制备方法10,将干燥樟芝子实体磨成细粉(步骤12),以1:10比例(重量/体积)置于75℃的乙醇溶液回流2小时(步骤14)。冷却萃取物,再置于4℃进行过夜沉淀。进一步以滤纸过滤该萃取物的上清液,以3,000rpm离心30分钟以去除沉淀物,将萃取物冷冻干燥并储存于-70℃,此即为樟芝子实体的乙醇萃取物(步骤16)。再将樟芝子实体的乙醇

萃取物以正己烷萃取,获得樟芝子实体的正己烷萃取物(简称正己烷萃取物,FNH,步骤18)及樟芝子实体残留物(步骤20)。

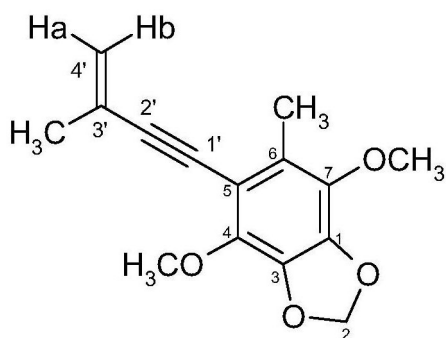
[0034] 为了在正己烷萃取物中探寻新颖的化合物,且为证实该化合物仅存在于正己烷萃取物而不存在于樟芝子实体的其他萃取物中,发明人参照专利申请号TW098104772所公开的方法,将前述的樟芝子实体残留物依序以乙酸乙酯及乙醇进行萃取,分别获得乙酸乙酯萃取物以及乙醇再萃取物,将本发明的正己烷萃取物与前述两种萃取物进行比较。

[0035] 实验2、樟芝子实体的正己烷萃取物的核磁共振图谱分析

[0036] 将正己烷萃取物(FNH)溶于 C_5D_5N 溶液,浓度为11.6mg/0.75ml,以分辨率400MHz进行 1H 核磁共振图谱实验。请参阅图2,其于 δ 6.48、5.93显示出FNH具有芳香族成分的主要特征信号(δ 6.48为芳香环上单个氢的信号, δ 5.93为亚甲二氧基的信号),于 δ 5.50显示出双键结构的特征信号,于 δ 3.87、3.78显示出甲氧基的特征信号。然而,在相同实验条件下,乙酸乙酯萃取物以及乙醇再萃取物则无上述特征信号(结果未显示)。而且FNH在高磁场区并未显示三萜类的甲基特征信号,仅于 δ 1.27、0.88出现长链结构信号。因此,由上述实验分析可确定正己烷萃取物为苯类化合物的浓缩层。

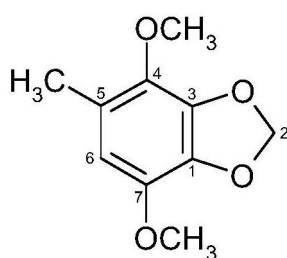
[0037] 实验3、樟芝子实体的正己烷萃取物的成分分离

[0038] 本发明萃取出化合物1~3,在此先将化合物1~3对应的结构式(式I至式III)详列如下。



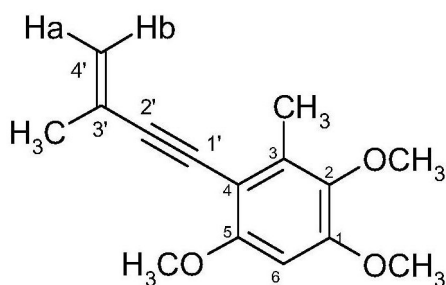
式 I

[0039]



式 II

[0040]



式 III

[0041] 为了区别式I及式III化合物的4'号碳上的两个H原子,将该两个H原子分别命名为Ha及Hb。

[0042] 为了分析此苯类化合物浓缩层的成分组成,将正己烷萃取物(FNH)进行柱分离分析,以硅胶60(silica gel 60,Merck,230-400目)及正己烷-乙酸乙酯(依序为1:0,50:1,40:1,30:1,20:1,10:1,5:1,1:1,0:1)梯度层析897.7mg正己烷萃取物,获得12种分馏产物,各分馏产物分别溶于 CDCl_3 溶液,以分辨率200MHz进行 ^1H 核磁共振图谱分析,第1分馏产物(Fraction 1)及第3分馏产物(Fraction 3)的图谱显示出芳香族成分的主要特征信号,详如下述。

[0043] 将245.4mg的第1分馏产物以Sephadex LH-20树脂及乙酸乙酯-二氯甲烷(1:1)层析,分离出5种次分馏物。将55.01mg的第4次分馏物(Subfraction 1-4)以制备型薄膜色谱分析及正己烷-乙酸乙酯(10:1)层析,取得47.5mg的次分馏产物。再将47.5mg的次分馏产物以ODS高效反向色谱柱(250×10mm,乙腈-水(80:20),流速2ml/min)纯化,于保留时间9.94分钟收集得3.3mg的化合物2,即4,7-二甲氧基-5-甲基-1,3-苯并间二氧杂环戊烯(4,7-dimethoxy-5-methyl-1,3-benzodioxole);于保留时间17.25分钟时收集得3.3mg的化合物1,即4,7-二甲氧基-5-(3-甲基丁-3-烯-1-炔基)-6-甲基-1,3-苯并间二氧杂环戊烯(4,7-dimethoxy-5-(3-methylbut-3-en-1-ynyl)-6-methyl-1,3-benzodioxole)。

[0044] 将27.7mg的第3分馏产物以Sephadex LH-20树脂及乙酸乙酯-二氯甲烷(1:1)进行分离,得到2个次分馏物。将11.8mg的第2次分馏产物(Subfraction 3-2)以制备型薄层色谱分析及二氯甲烷进行分离,得到10.0mg的化合物3,即安卓凯因A(antrocaphine A),或称为1,2,5-三甲氧基-3-甲基-4-(3-甲基丁-3-烯-1-炔基)苯(1,2,5-trimethoxy-3-methyl-4-(3-methylbut-3-en-1-ynyl)benzene)。

[0045] 实验4、樟芝子实体的正己烷萃取物的主成分结构鉴定

[0046] 化合物1为白色非结晶固体,以电喷雾离子化质谱(ESIMS, m/z 261 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 、283 $[\text{M}+\text{Na}]^+$)及核磁共振图谱分析后的分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_4$ 。请参阅表1,化合物1的 ^1H 核磁共振图谱显示两个甲基的信号在 δ_{H} 2.01(3H,s)及2.27(3H,s),两个甲氧基的信号在 δ_{H} 3.87(3H,s)及3.98(3H,s),两个末端烯烃亚甲基质子(terminal olefinic methylene proton)(δ_{H} 5.26及5.37),一个亚甲二氧基的信号在 δ_{H} 5.94(2H,s)。通过量子相关(quantum coherence, QC)以及异核多键相关(heteronuclear multiple-bond coherence, HMBC)的辅助,可确定 ^{13}C 核磁共振图谱所对应于 ^1H 核磁共振图谱的信号(表1),显示一个芳香环上甲基(aromatic methyl)的信号在 δ_{C} 13.9(6- CH_3),一组3-甲基丁基-3-烯-1-炔基(3-methylbut-3-en-1-ynyl)的信号在 δ_{C} 83.5($\text{C}-1'$)、97.5($\text{C}-2'$)、127.2($\text{C}-3'$)、121.0(CH_2-4')、23.6($3'-\text{CH}_3$),两个甲氧基的信号在 δ_{C} 60.4(4- OCH_3)及60.0(7- OCH_3),一组苯并间二氧杂环戊烯(benzodioxole)的信号在 δ_{C} 139.5($\text{C}-1$)、101.4(CH_2-2)及136.2($\text{C}-3$)。

[0047] 表1、化合物1的 ^1H 及 ^{13}C NMR数据(CDCl_3 的600及150MHz, δ 以ppm为单位,J以Hz为单位)

位置	化合物 1	
	δ_{H} (J 以 Hz 计)	δ_{C}
1		139.5 (s)
2	5.94 (2H, s)	101.4 (t)
3		136.2 (s)
4		139.8 (s)
[0048] 5		109.8 (s)
6		127.9 (s)
7		137.2 (s)
1'		83.5 (s)
2'		97.5 (s)
3'		127.2 (s)
4'	a 5.26 (1H, br s) b 5.37 (1H, br s)	121.0 (t)
4-OCH ₃	3.98 (3H, s)	60.4 (q)
[0049] 6-CH ₃	2.27 (3H, s)	13.9 (q)
7-OCH ₃	3.87 (3H, s)	60.0 (q)
3'-CH ₃	2.01 (3H, s)	23.6 (q)

[0050] 请参阅图3,根据化合物1的NOESY图谱的分析数据: δ_{H} 3.98(4-OCH₃)/2.01(3'-CH₃)、 δ_{H} 2.01(3'-CH₃)/5.26(4'-Ha)、5.26(4'-Ha)/5.37(4'-Hb)及2.27(6-OCH₃)/3.87(7-OCH₃),可确定化合物1的各官能团在苯环上的取代位置。

[0051] 请参阅图4,再通过HMBC确认,化合物1的一组苯并间二氧杂环戊烯信号位于C-1位置(δ_{C} 139.5)以及C-3位置(δ_{C} 136.2),两个甲氧基分别位于C-4位置(δ_{C} 139.8)以及C-7位置(δ_{C} 137.2)、一组3-甲基丁基-3-烯-1-炔基位于C-5位置(δ_{C} 109.8),一个甲基位于C-6位置(δ_{C} 127.9)。因此,此新颖化合物1被命名为4,7-二甲氧基-5-(3-甲基丁-3-烯-1-炔基)-6-甲基-1,3-苯并间二氧杂环戊烯(4,7-dimethoxy-5-(3-methylbut-3-en-1-ynyl)-6-methyl-1,3-benzodioxole)。

[0052] 化合物2为白色的非结晶固体,以电喷雾离子化质谱(ESIMS, m/z 197[M+H]⁺)及核磁共振图谱分析后的分子式为C₁₀H₁₂O₄。其¹H核磁共振图谱(CDCl₃ 400MHz)的特征信号显示一个芳香环上甲基的信号在 δ_{H} 2.18(3H, d, $J=0.6\text{Hz}$),两个甲氧基的信号在 δ_{H} 3.84(7-OCH₃, s)及3.88(4-OCH₃, s),一个亚甲二氧基的信号在 δ_{H} 5.93(2H, s),芳香环上单个氢的信号在 δ_{H} 6.30(1H, d, $J=0.6\text{Hz}$)。¹³C核磁共振图谱(CDCl₃ 100MHz)的特征信号显示一个芳香环上甲基的信号在 δ_{C} 15.9,两个甲氧基的信号在 δ_{C} 56.9及59.9,一个亚甲二氧基的信号在 δ_{C} 101.4。根据NOESY图谱的分析数据: δ_{H} 3.88(4-OCH₃)/2.18(5-CH₃)、 δ_{H} 2.18(5-CH₃)/6.30(6-H)及6.30(6-H)/3.84(7-OCH₃),确定出化合物2的各官能团在苯环上的取代位置。通过HMBC的辅助可确认六个芳香环的碳信号在 δ_{C} 134.7(C-1)、138.6(C-3)、136.5(C-4)、123.7(C-5)、108.8(CH-6)及138.8(C-7)。如上所示的结构。

[0053] 化合物3为黄色油状,以电喷雾离子化质谱(ESIMS, m/z 247 $[M+H]^+$)及核磁共振图谱分析后的分子式为 $C_{15}H_{18}O_3$ 。其 1H 核磁共振图谱($CDCl_3$ 400MHz)的特征信号为两个甲基的信号在 δ_H 2.01(3'-CH₃, t, $J=1.6$ Hz)及2.36(3-CH₃, s),三个甲氧基的信号在 δ_H 3.72(2-OCH₃, s)、3.86(1-OCH₃, s)及3.88(5-OCH₃, s),两个末端烯烃亚甲基质子在 δ_H 5.25及5.37,芳香环上单个氢的信号在 δ_H 6.33(1H, s)。 ^{13}C 核磁共振图谱($CDCl_3$ 100MHz)的特征信号显示一个芳香环上甲基的信号在 δ_C 14.1(3-CH₃),一组3-甲基丁基-3-烯-1-炔基的信号在 δ_C 83.5(C-1'), 97.5(C-2'), 127.3(C-3'), 120.7(CH₂-4')及23.7(3'-CH₃),三个甲氧基的信号在 δ_C 56.3(1-OCH₃), 60.4(2-OCH₃)及55.8(5-OCH₃),六个芳香环的碳信号在 δ_C 157.2(C-1), 141.1(C-2), 135.3(C-3), 104.8(C-4), 153.4(C-5)及94.4(CH-6)。通过NOESY以及HMBC的辅助可确认此化合物3如上所示的结构。

[0054] 实验5、樟芝子实体的正己烷萃取物与其主成分的核磁共振图谱比较

[0055] 将正己烷萃取物(FNH)及化合物1~3都溶于 $CDCl_3$ 溶液,比较其 1H 核磁共振图谱。请参阅图5(a),可观察到正己烷萃取物的甲氧基的特征信号在 δ_H 3.7~4.0之间,亚甲二氧基的特征信号在 δ_H 5.9~6.0之间,芳香环上单个氢的特征信号在 δ_H 6.2~6.4之间。请参阅图5(b)至图5(d),正己烷萃取物所呈现的特征信号都与化合物1~3的个别特征信号符合。由上述实验分析不但可再次确定正己烷萃取物为苯类化合物的浓缩层,而化合物1~3也是此苯类化合物浓缩层的主成分。

[0056] 实验6、以核磁共振图谱检测樟芝子实体苯类化合物的含量

[0057] 检测实验流程如下,首先选择适当的内部标准品,此标准品必须具备高纯度及高安定性,且其核磁共振光谱的特征信号不被分析样品中所含的特征信号干扰。接着添加一定量的内部标准品于所分析的样品中,选择适当的氘代溶剂进行核磁共振光谱分析,计算化合物标的特征信号与内部标准品特征信号的积分面积比值,带入绝对含量公式即可求得各化合物的绝对含量。

[0058] 本发明利用核磁共振图谱分析法进行正己烷萃取物(FNH)的主成分化合物1~3的定量分析。实验条件如下,取10.0mg的正己烷萃取物,加入0.132mg的内部标准品吡嗪(pyrazine),同时溶于0.6mL的 $CDCl_3$ 溶液作为进行核磁共振光谱分析的测试溶剂,核磁共振仪为Varian UNITY plus 400MHz光谱仪,扫描次数为10次(7分钟),光谱宽度为6002.4Hz,强度脉冲宽度为6.3 μ s。再进一步使用手动选择各化合物的标的特征质子吸收信号的起点及终点求得该波峰积分面积作为此定量分析方法的依据,整个试验进行三重复并计算其相对标准偏差的数值(RSD%)。

[0059] 藉由实验4中建立的三主量化合物 1H 核磁共振图谱信号,选定各别化合物的特征质子信号作为标的特征信号,分别是化合物1中C-4位置的甲氧基信号 δ_H 3.98(3H, s)、化合物2中C-5位置的甲基信号 δ_H 2.18(3H, d, $J=0.6$ Hz)以及化合物3中C-3位置的甲基信号 δ_H 2.36(3H, s)。请参阅图6(a)至图6(c),以内部标准品特征信号(δ_H 8.60)的积分面积为基准,分别求得化合物1~3中各标的特征信号与内部标准品特征信号的积分面积比值,结果请参阅表2。

[0060] 表2、各化合物 1H 核磁共振标的特征信号与内部标准品特征信号的积分面积比值(三重复试验)

[0061]

化合物	标的特征信号	δ_{H} (J 以 Hz 计)	面积积分比		
			实验一	实验二	实验三
1	4-OCH ₃	3.98 s	0.42	0.41	0.40
2	5-CH ₃	2.18 d (0.6)	3.34	3.50	3.38
3	3-CH ₃	2.36 s	0.90	0.94	0.92

[0062] 将所得的积分面积比值带入下列定量公式1,即可求得化合物1~3于樟芝子实体的正己烷萃取物中的含量。

$$[0063] \quad \left[\frac{(0.22\text{mg}/80) \times B \times A}{H} \right] \times MW \quad (\text{定量公式 1})$$

[0064] 其中80为内部标准品吡嗪的分子量,A为化合物1~3中各标的特征信号与内部标准品特征信号的积分面积比值,B表示内部标准品氢质子的数目(吡嗪的氢质子数目为4),H代表化合物1~3中各标的化合物的特征信号的氢质子数目(化合物1标的特征信号为4-OCH₃,H为3;化合物2标的特征信号为5-CH₃,H为3;化合物3标的特征信号为3-CH₃,H为3),MW为各化合物的分子量(化合物1为260,化合物2为196,化合物3为246)。

[0065] 由上述检测方式求得樟芝子实体的正己烷萃取物中化合物1~3的绝对含量以及实验的相对标准偏差的数值(RSD%)。请参阅表3,三重复试验中的相对标准偏差值在可接受的范围,由此可得知化合物1~3为樟芝子实体的正己烷萃取物中的主成分,也为樟芝子实体苯类化合物中的主成分。

[0066] 表3、各化合物占樟芝子实体的正己烷萃取物中的含量(三重复试验)

[0067]

化合物	含量(每 10 mg 樟芝子实体的正己烷萃取物中所含重量)			平均值	相对标准偏差
	实验一	实验二	实验三		
1	0.40 mg	0.39 mg	0.38 mg	0.39 mg	2.6 %
2	2.40 mg	2.51 mg	2.42 mg	2.44 mg	2.4%
3	0.81 mg	0.85 mg	0.83 mg	0.83 mg	2.4%

[0068] 实验7、利用高效液相色谱及质谱仪分析法进行樟芝子实体苯类化合物含量检测

[0069] 利用高效液相色谱法进行樟芝子实体的正己烷萃取物(FNH)中的主成分相对含量分析,将所获得的三个主成分化合物1~3与樟芝子实体的正己烷萃取物进行高效液相色谱图的比对,高效液相色谱的条件如下:高效液相色谱仪为Shimadzu LC-10AT;检测器为Shimadzu SPD-M10A photodiode array detector;自动取样器为Shimadzu SIL-20A prominence auto sampler;高效液相色谱柱为Cosmosil 5C-18-MS 250x 4.6mm;流动相中的溶剂A为乙腈,溶剂B为水;流速为1ml/min;柱温度为室温,检测波长为254nm及270nm。溶媒系统条件如下:流动相包括溶剂A及B,线性梯度为0~60分钟30%A~100%A;流速及柱温度如上所述。

[0070] 请参阅图7(a)、图7(b)及表4,为樟芝子实体的正己烷萃取物于254nm波长进行高效液相色谱后的各种成分的面积及高度百分比比较。于波长254nm、保留时间为41.149、24.489以及30.006分钟,分别代表化合物1~3的色谱波峰。三种化合物的面积百分比分别是16.91%、17.30%以及24.87%,而总计为59.08%;而高度百分比分别是15.90%、17.62%以及24.30%,而总计为57.82%。由此可得知化合物1~3为樟芝子实体的正己烷萃取物中的主成分,也为樟芝子实体苯类化合物中的主成分。

[0071] 表4、樟芝子实体的正己烷萃取物于254nm波长进行高效液相色谱后的各种成分的面积及高度比较

[0072]

产物	保留时间	面积百分比	高度百分比
化合物 1	41.149	16.91	15.90
化合物 2	24.489	17.30	17.62
化合物 3	36.006	24.87	24.30
其余		40.92	42.18
总计		100.00	100.00

[0073] 请参阅图8(a)、图8(b)及表5,为樟芝子实体的正己烷萃取物于270nm波长进行高效液相色谱后的各种成分的面积及高度百分比比较。于波长270nm、保留时间为41.149、24.489以及30.006分钟,分别代表化合物1~3的色谱波峰。三种化合物的面积百分比分别是16.97%、11.50%以及25.54%,而总计为54.01%;而高度百分比分别是19.81%、12.52%以及27.00%,而总计为59.33%。由此可得知化合物1~3为樟芝子实体的正己烷萃取物中的主成分,也为樟芝子实体苯类化合物中的主成分。

[0074] 表5、樟芝子实体的正己烷萃取物于270nm波长进行高效液相色谱后的各种成分的面积及高度比较

[0075]

产物	保留时间	面积百分比	高度百分比
化合物 1	41.149	16.97	19.81
化合物 2	24.489	11.50	12.52
化合物 3	36.006	25.54	27.00
其余		45.99	40.67
总计		100.00	100.00

[0076] 此外,利用高效液相色谱仪串联电喷雾离子化质谱仪(HPLC-ESI-MS)于正离子模式中确认樟芝子实体的正己烷萃取物(FNH)中的主成分化合物1~3标准品的分子量。高效液相色谱的条件如下:高效液相色谱仪为Agilent 1100series;高效液相色谱柱为Cosmosil 5C-18-MS 250×4.6mm;流动相中的溶剂A为乙腈、溶剂B为0.1%甲酸H₂O;流速为1ml/min;柱温度为室温、检测波长为254nm及270nm。溶媒系统条件如下:流动相包括溶剂A及B、线性梯度为0~60分钟30%A~100%A;流速及柱温度如上所述。质谱仪为Thermo

Finnigan LCQ DECA XP^{plus}。我们得到化合物1保留时间为38.22分钟,主离子峰位于m/z 261[M+H]⁺,检测得化合物1分子量为260;化合物2保留时间为22.39分钟,主离子峰位于m/z 197[M+H]⁺,检测得化合物2分子量为196;化合物3保留时间为33.13分钟,主离子峰位于m/z 247[M+H]⁺,检测得化合物3分子量为246。

[0077] 由上述核磁共振分析及高效液相色谱串联质谱仪分析的结果可知,4,7-二甲氧基-5-(3-甲基丁-3-烯-1-炔基)-6-甲基-1,3-苯并间二氧杂环戊烯(化合物1)、4,7-二甲氧基-5-甲基-1,3-苯并间二氧杂环戊烯(化合物2)及1,2,5-三甲氧基-3-甲基-4-(3-甲基丁-3-烯-1-炔基)苯(化合物3)为樟芝子实体的正己烷萃取物中的主要成分。前述的实验方法可作为产业上检测樟芝子实体苯类化合物的利器。

[0078] 本发明实属难能的创新发明,深具产业价值,依法提出申请。此外,本发明可以由本领域技术人员做任何修改,但不脱离如所附权利要求所要保护的范围。

10

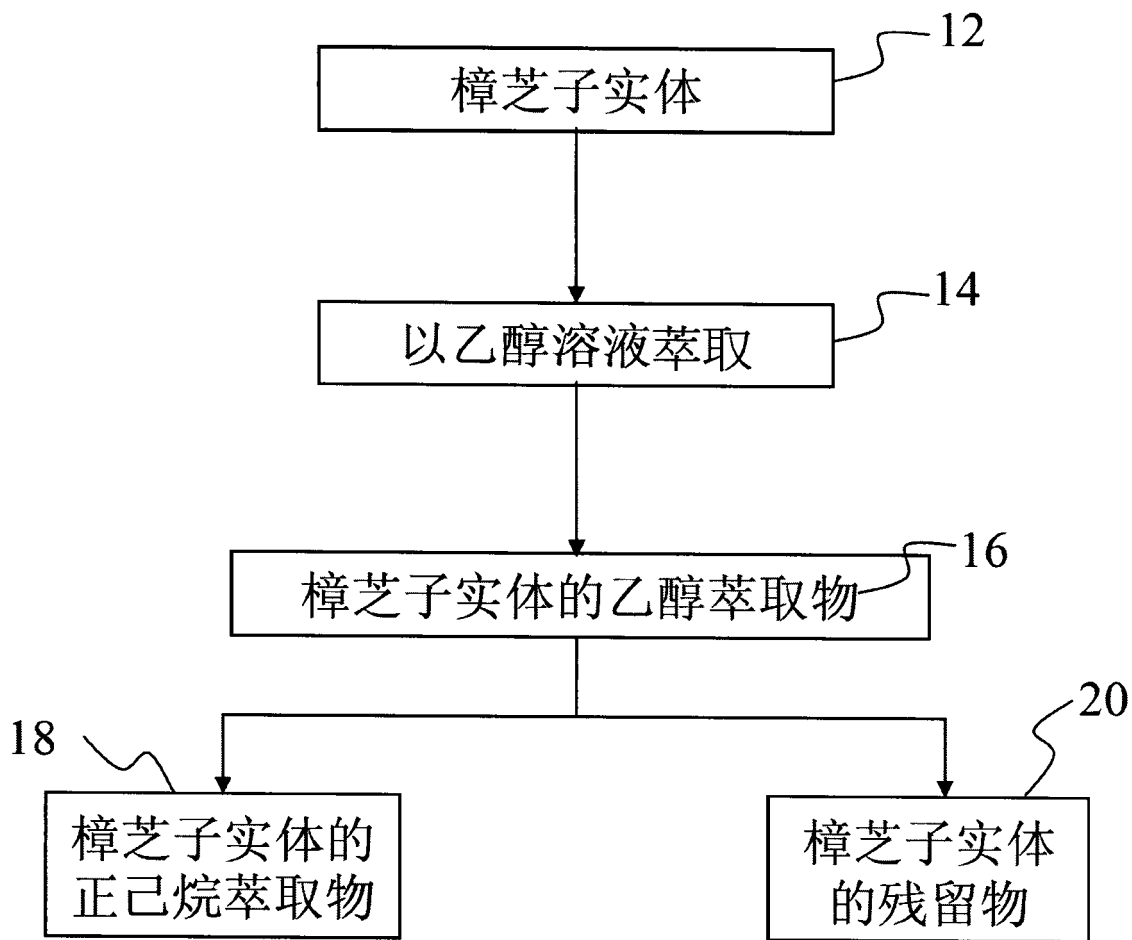


图1

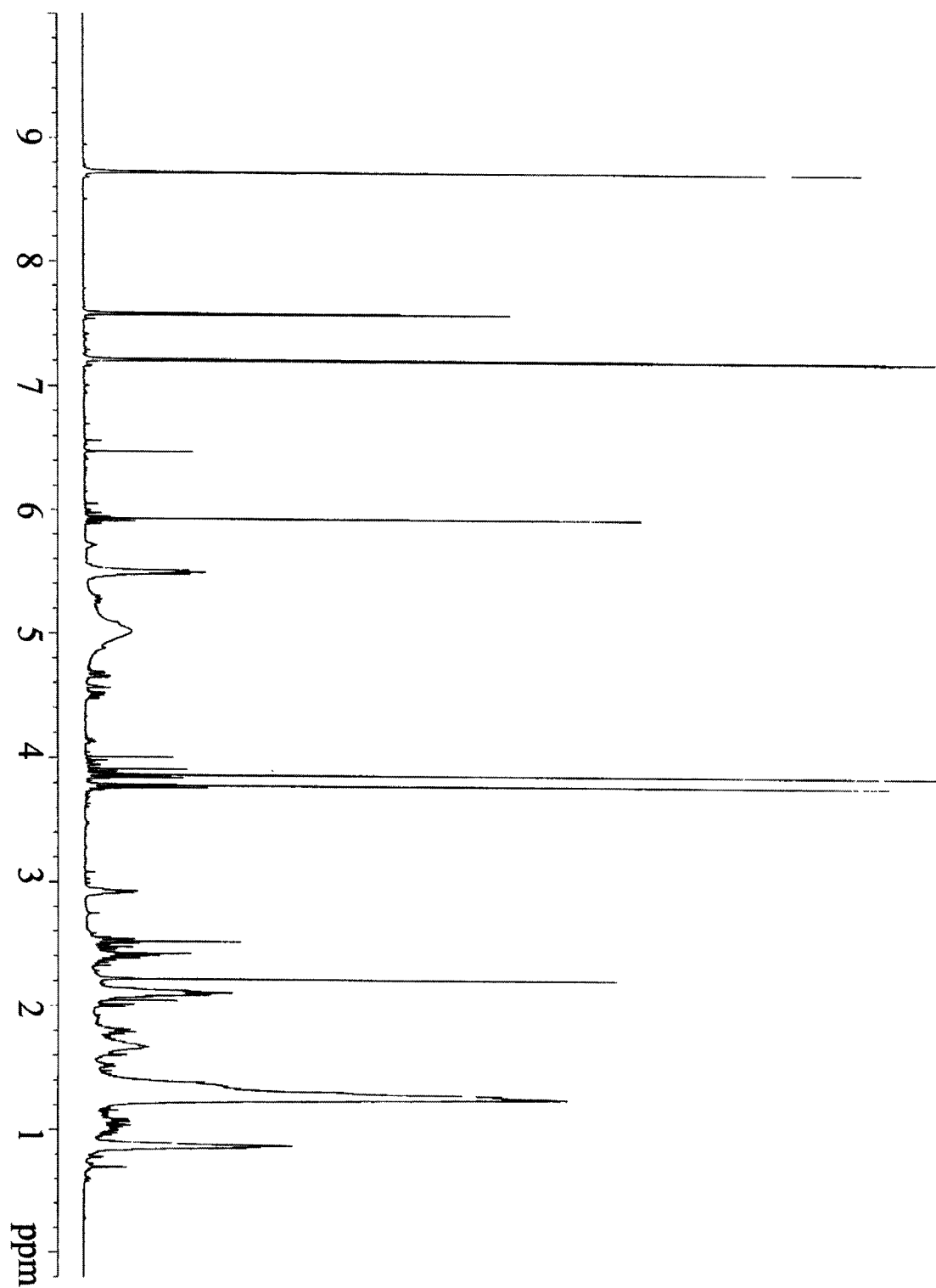


图2

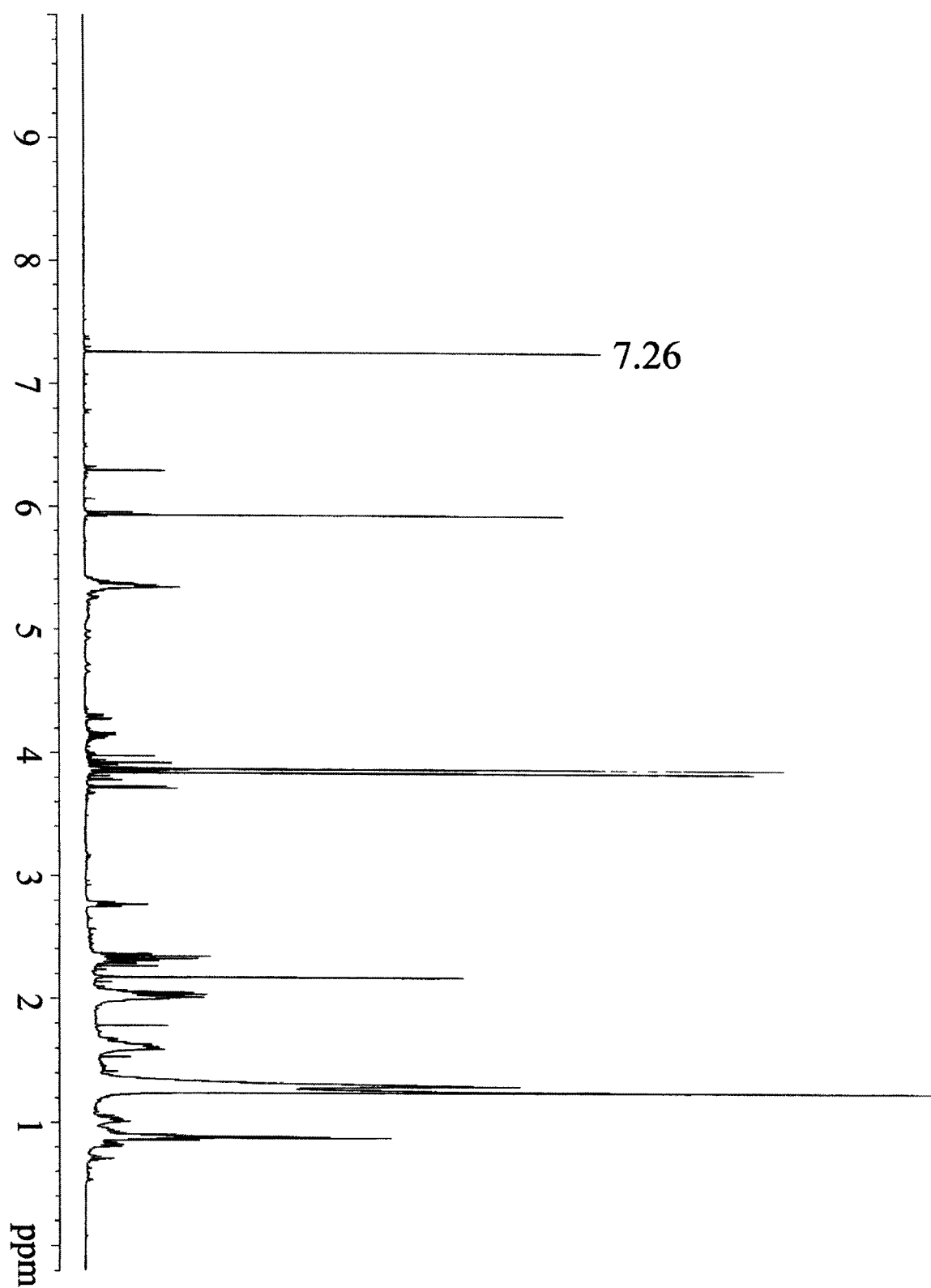


图5(a)

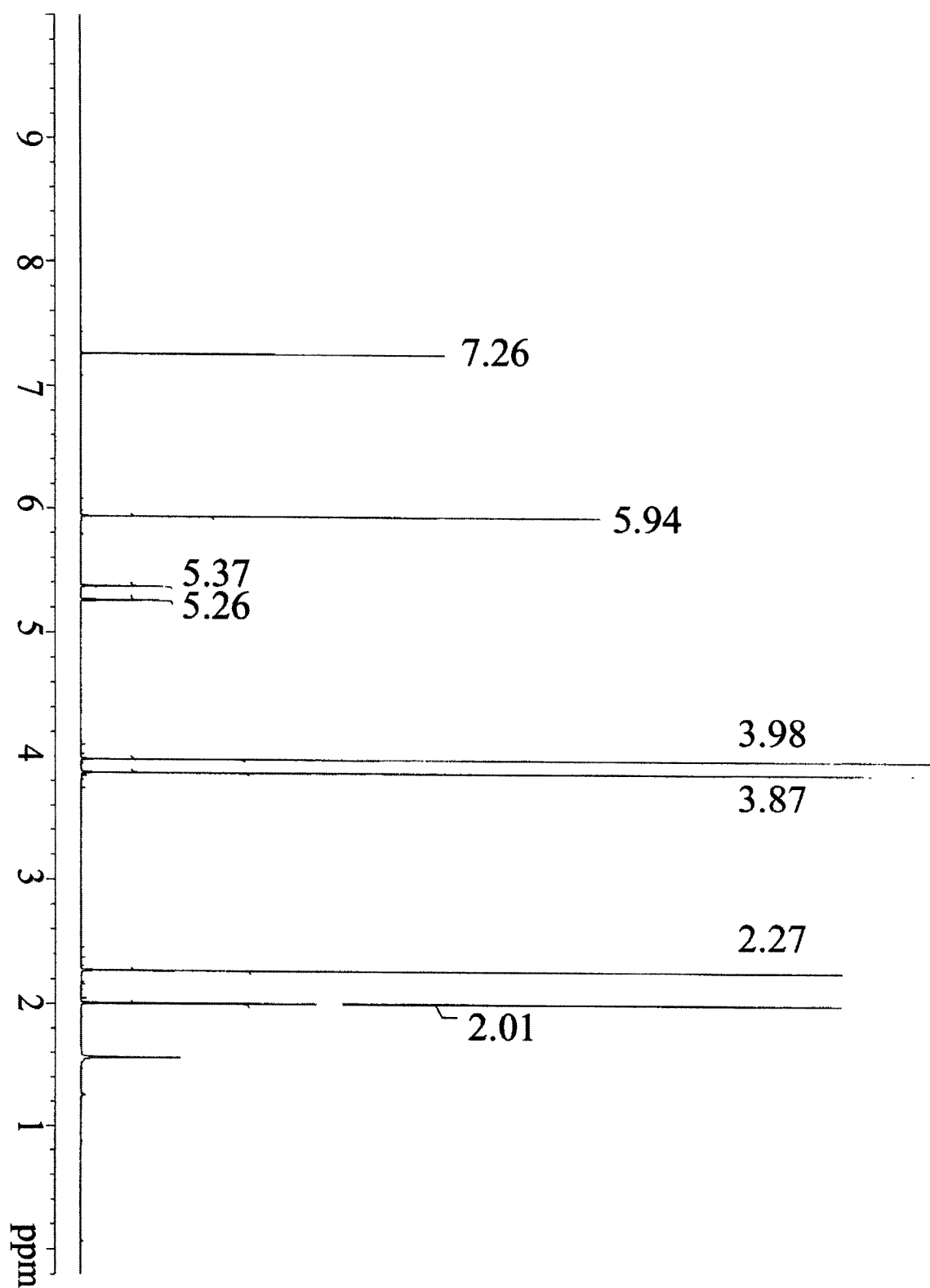


图5(b)

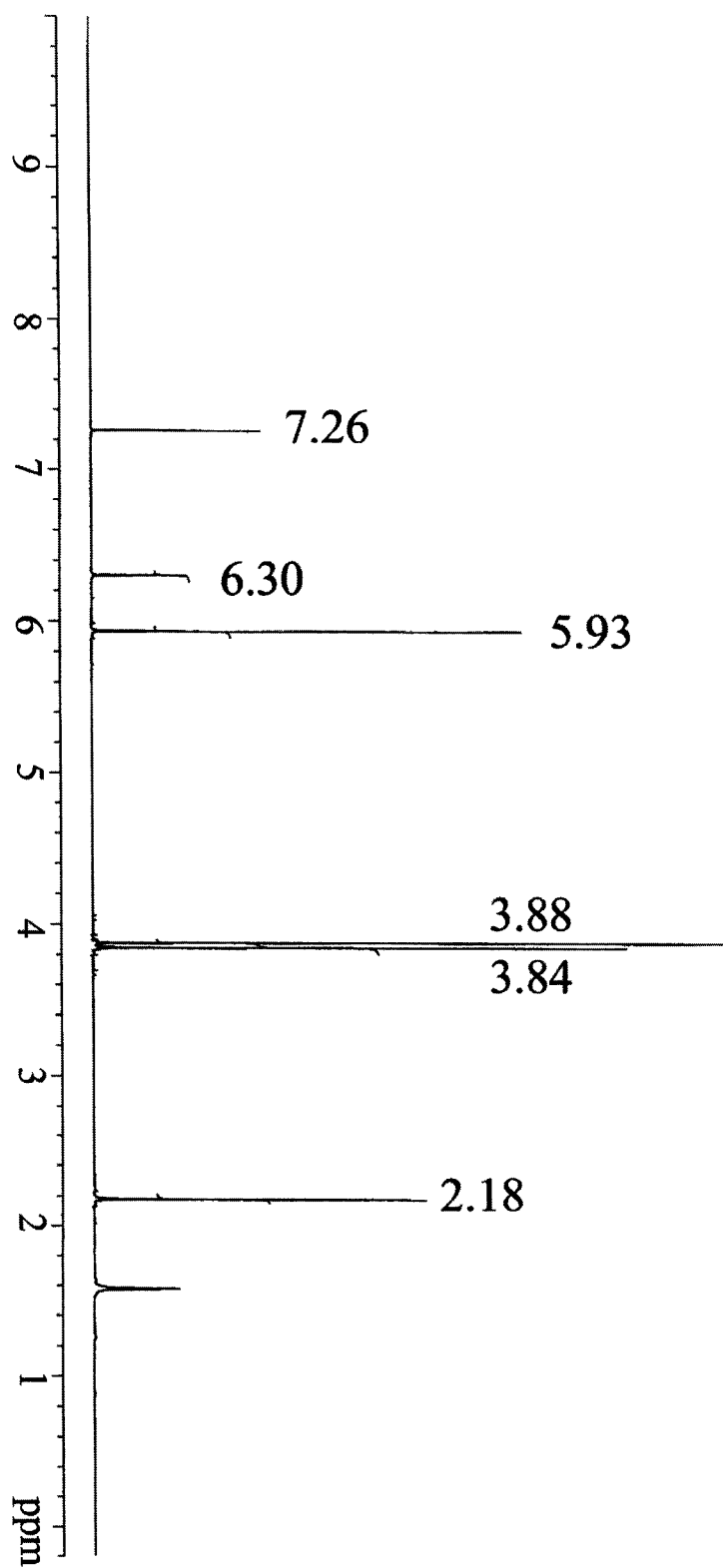


图5(c)

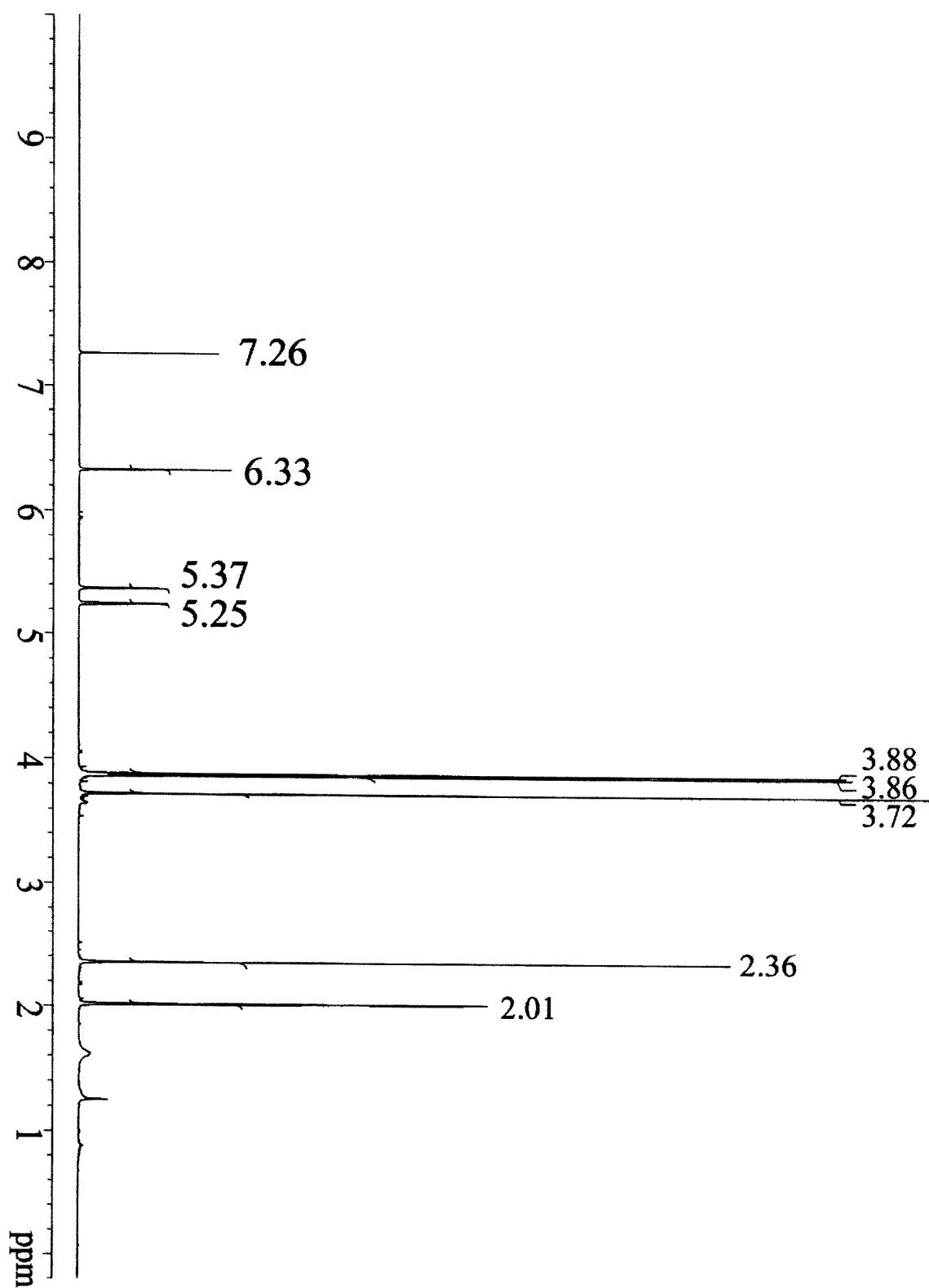


图5(d)

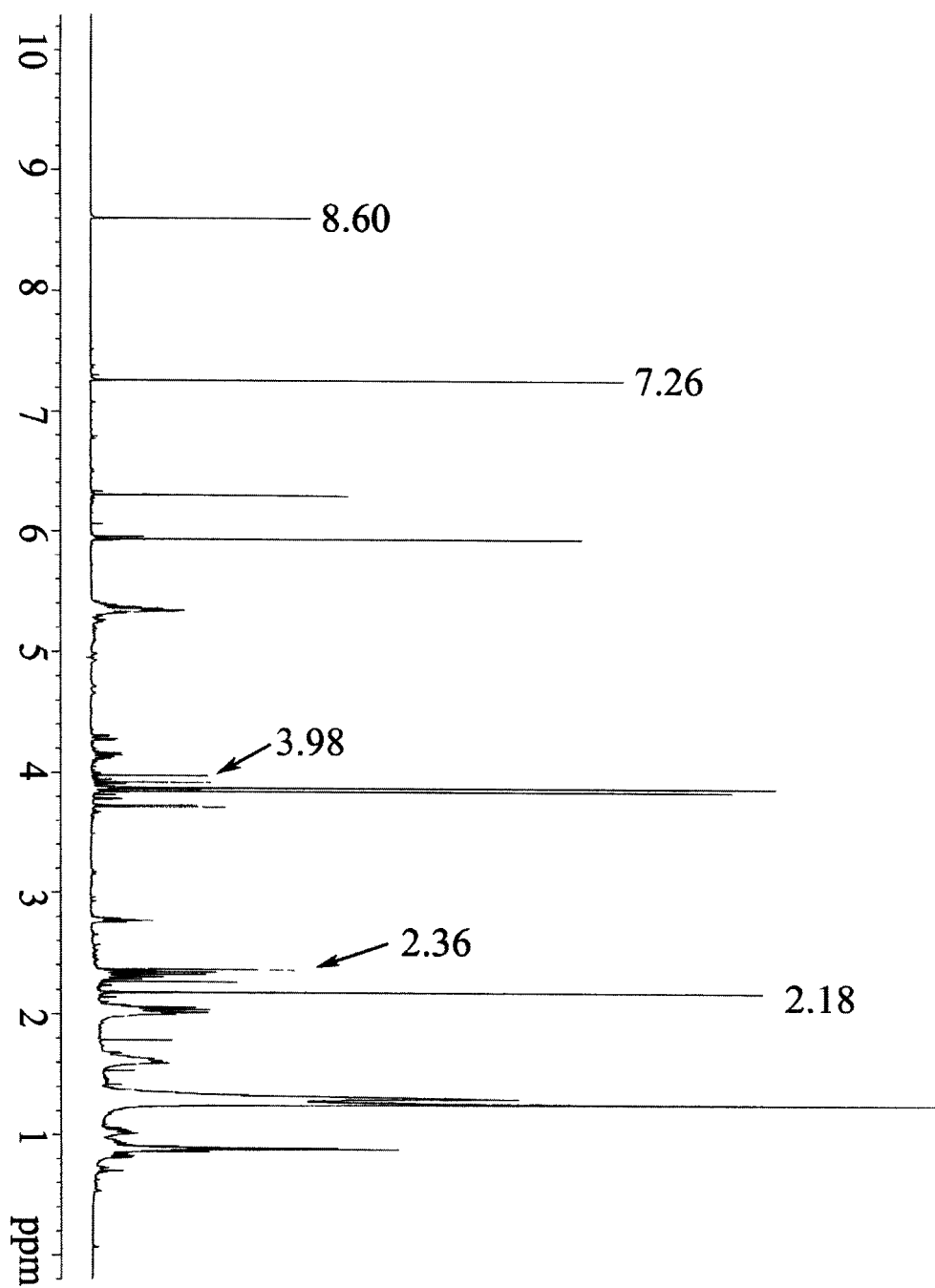


图6(a)

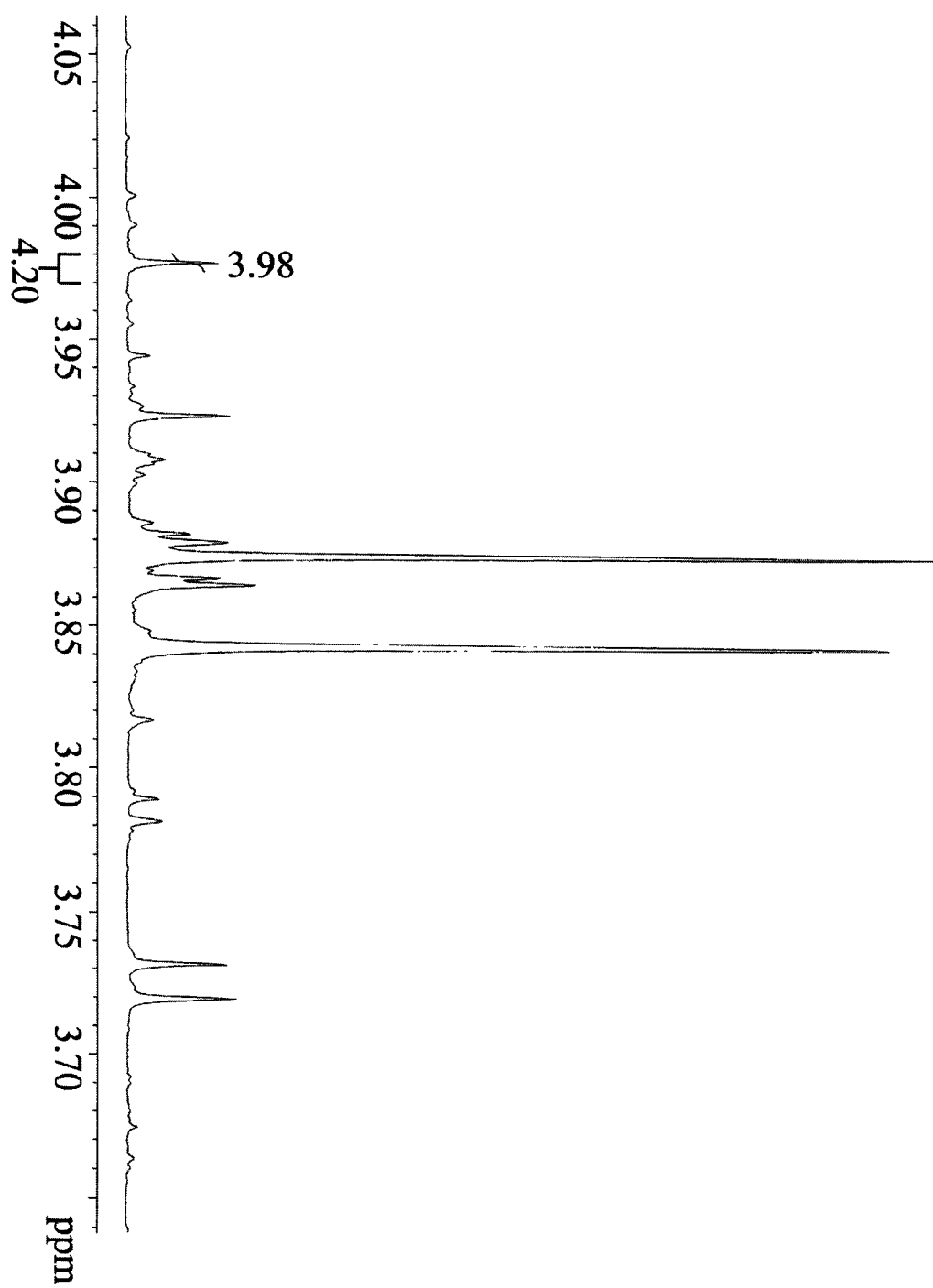


图6(b)

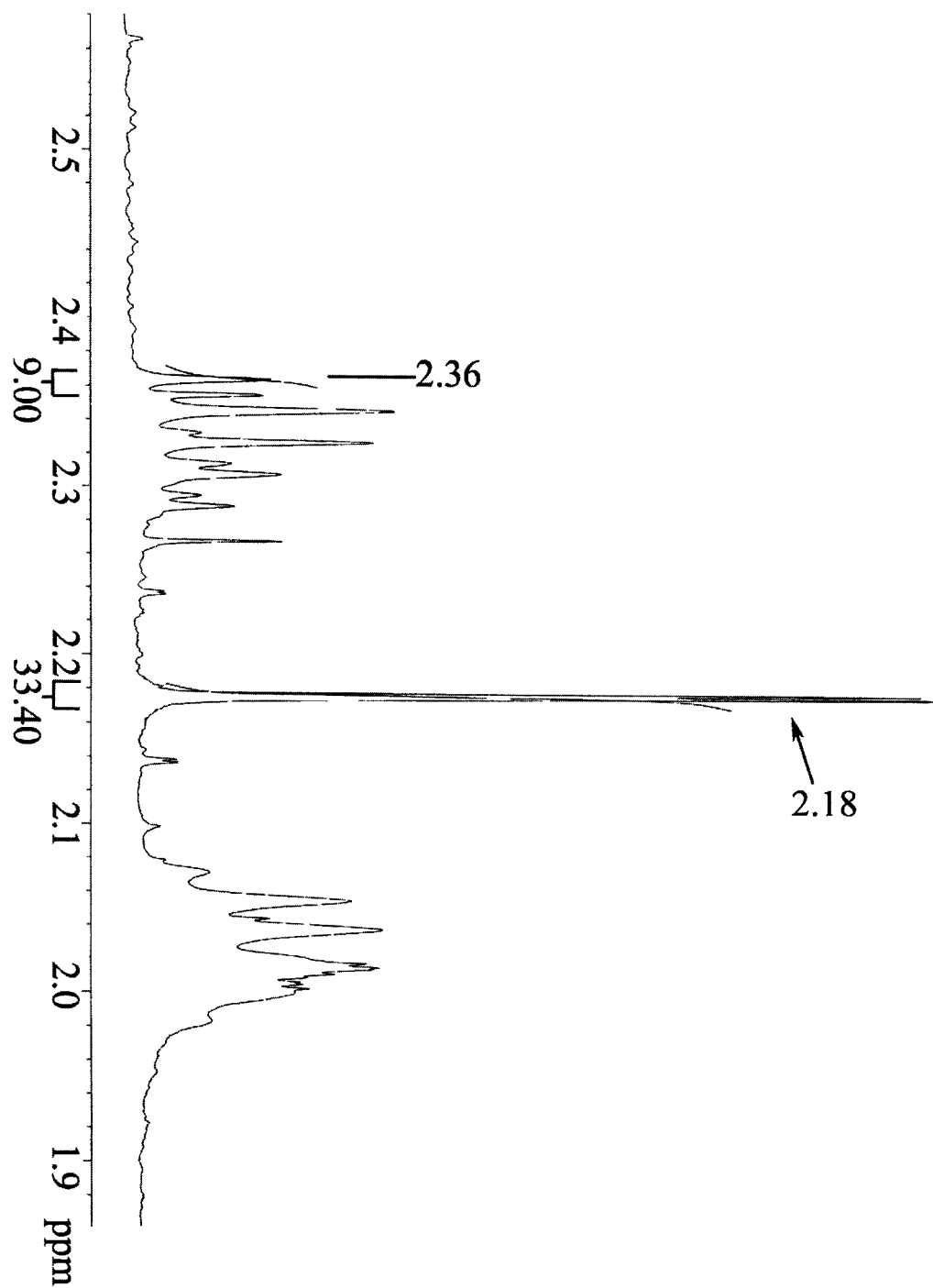


图6(c)

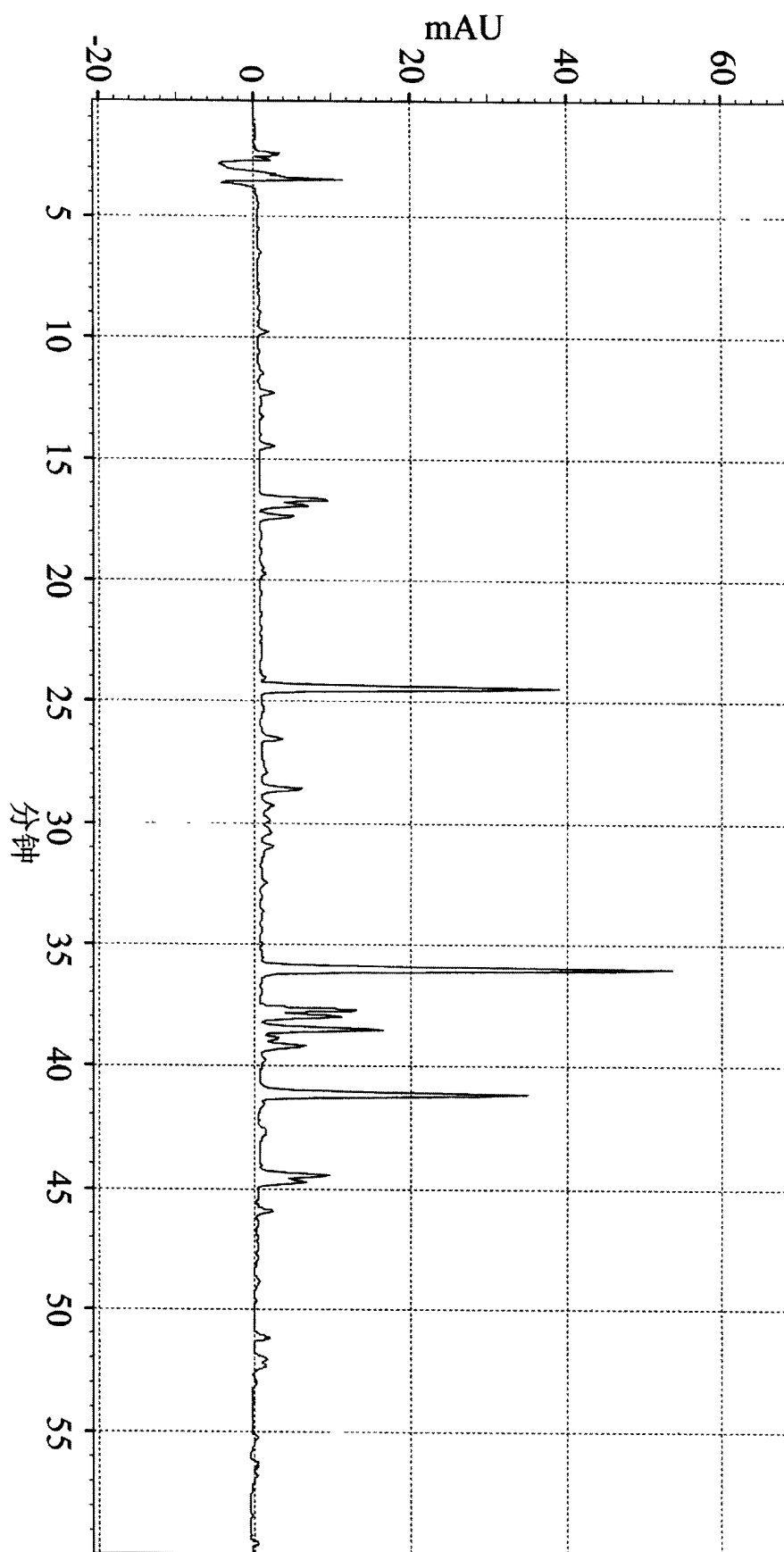


图7(a)

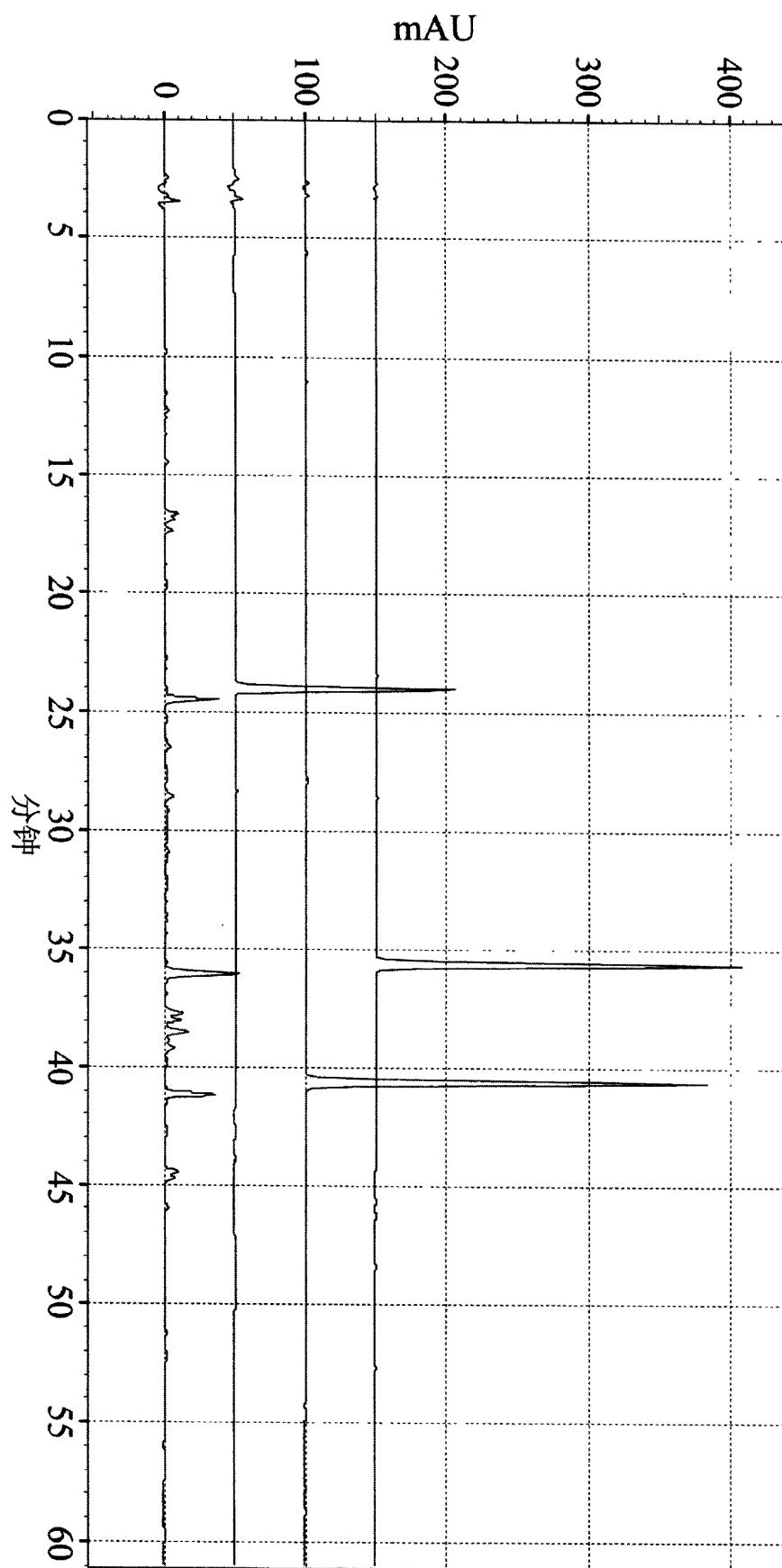


图7(b)

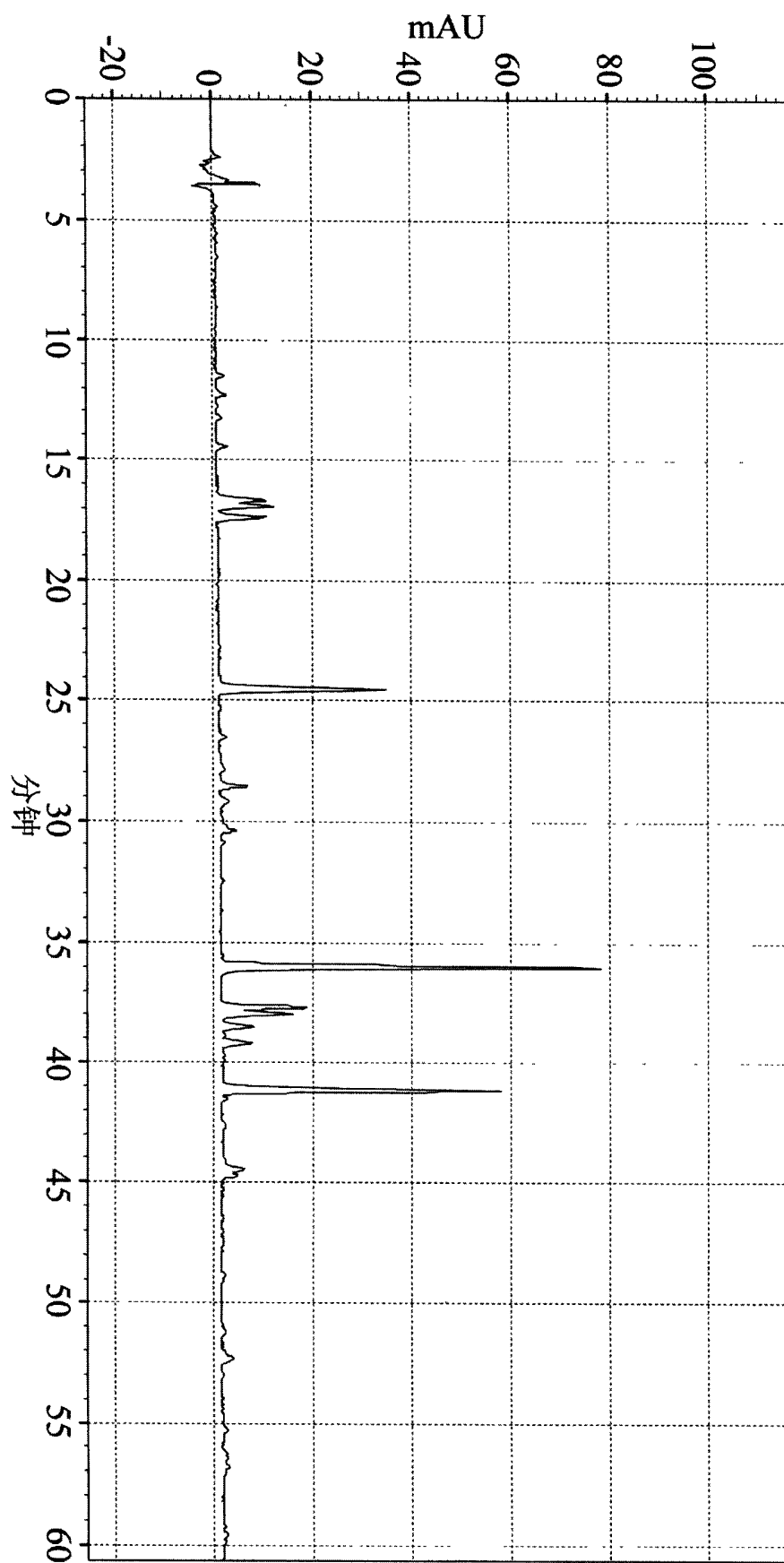


图8(a)

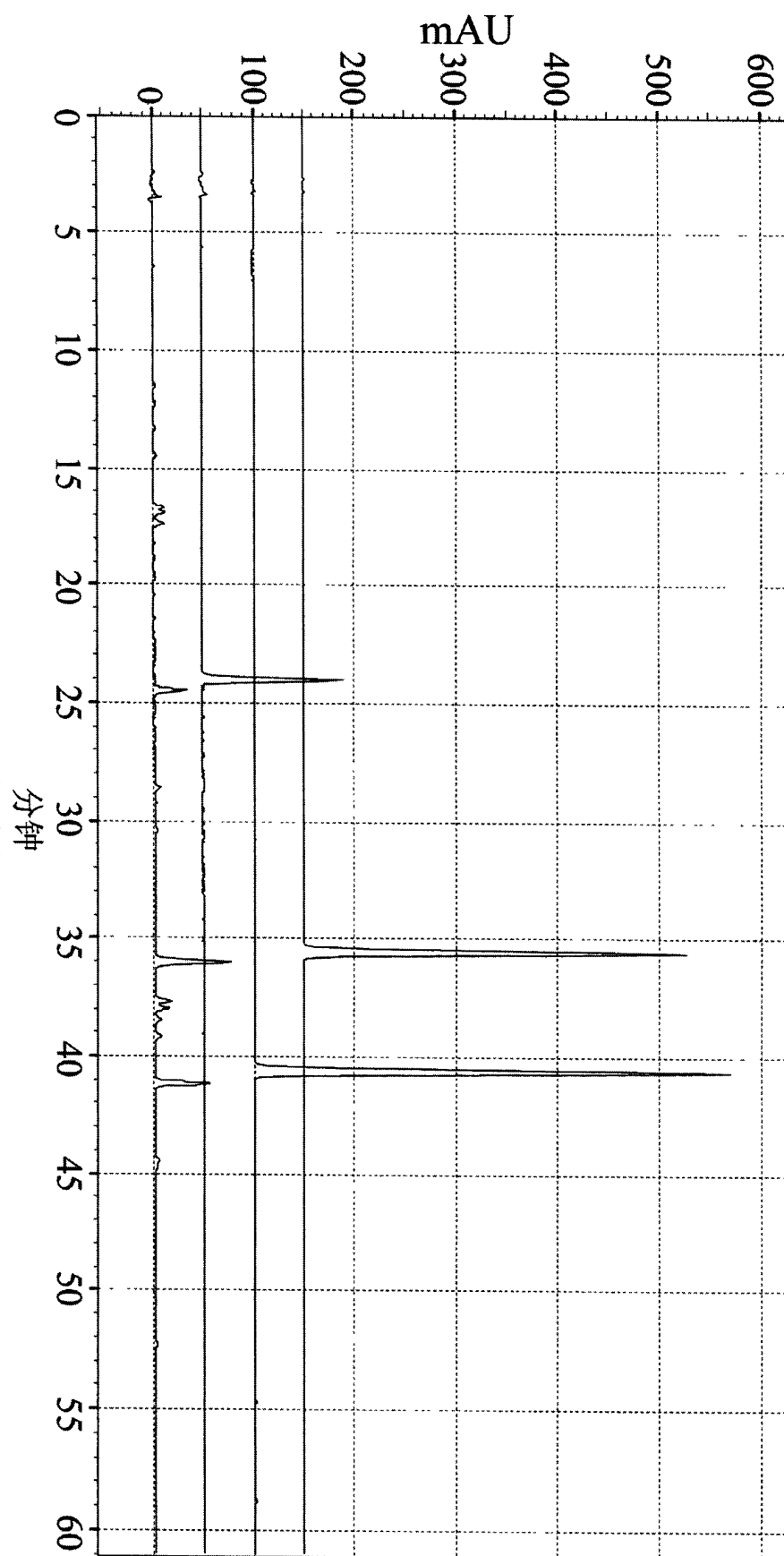


图8(b)